

CHUYỂN PHÔI NGÀY 5 GIÚP CẢI THIẾN TỶ LỆ THAI LÂM SÀNG TRÊN BỆNH NHÂN THẤT BẠI LÀM TỔ SAU THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM

Nguyễn Ngọc Quỳnh^{***}, Nguyễn Hữu Duy^{***}, Bùi Thị Thu Hiền*,
Trần Tú Cẩm*, Phạm Dương Toàn*, Đặng Quang Vinh^{***}

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá hiệu quả của chuyển phôi ngày 5 trên đối tượng thất bại làm tổ sau TTTON. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** nghiên cứu loạt ca, được tiến hành trên 45 chu kỳ thất bại làm tổ tại IVF Vạn Hạnh trong thời gian từ tháng 8/2011 đến tháng 6/2012. Bệnh nhân được gọi là thất bại làm tổ khi không có thai sau 3 chu kỳ chuyển phôi, với ít nhất 8 phôi tốt được chuyển. Phôi sau thụ tinh trong ống nghiệm được nuôi cấy trong môi trường ISM1 trong hai ngày đầu, sau đó, được nuôi cấy tiếp trong môi trường BlastAssist (Origio, Đan Mạch) đến ngày 5 trong môi trường 6%CO₂, 7%O₂. Yếu tố đánh giá kết quả chính là tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ của phôi. Yếu tố đánh giá kết quả phụ bao gồm tỷ lệ có phôi ngày 5, tỷ lệ có phôi tốt ngày 5, tỷ lệ đa thai. **Kết quả:** Đặc điểm chung của các trường hợp thất bại nhiều lần tương đương nhau giữa các chu kỳ thất bại trước và trong chu kỳ nghiên cứu. 100% chu kỳ điều trị có phôi ngày 5 để chuyển. Tỷ lệ phôi ngày 5 có chất lượng tốt là 35,5%. Với số lượng phôi chuyển trung bình $1,5 \pm 0,7$, tỷ lệ thai lâm sàng đạt được là 41,9% với tỷ lệ làm tổ là 25,3%. Có 3 trường hợp đa thai được ghi nhận (song thai). **Kết luận:** Đây là nghiên cứu đầu tiên về chuyển phôi ngày 5 trên đối tượng thất bại làm tổ nhiều lần tại Việt Nam. Kết quả cho thấy chuyển phôi ngày 5 có thể là một trong những phương pháp hiệu quả nhằm cải thiện tỷ lệ thai lâm sàng và hạn chế tình trạng đa thai trên đối tượng này. **Từ khóa:** thất bại làm tổ, chuyển phôi ngày 5, tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ

Abstract

Blastocyst transfer can improve clinical pregnancy and implantation rates in patients with repeated implantation failure

Objective: To evaluate the effectiveness of blastocyst transfer in patients with repeated implantation failure at IVF Vạn Hạnh. **Method:** This is a case series study. 45 IVF cycles with RIF at IVF Vạn Hạnh were recruited from August/2011 to June/2012. Primary outcomes were clinical pregnancy rate and implantation rate. Blastulation rate, good quality embryo rate and multiple pregnancy rate were used as secondary outcomes. **Results:** The baseline characteristics of patients were similar between previous cycles and in treatment cycle. 100%

of treatment cycles had blastocysts to transfer. The rate of good quality embryo was 35.5%. Mean number of embryo transferred was 1.5 ± 0.7 . The clinical pregnancy rate was 41.9%, implantation rate was 25.3%. There were 3 cases with twins. **Conclusion:** This was the first study to assess day 5 embryo transfer for patients with repeated implantation failure in Vietnam. Our results showed that blastocyst transfer can help to improve clinical pregnancy rate as well as implantation rate in RIF patients.

Keywords: repeated implantation failure, clinical pregnancy rate, implantation rate, blastocyst transfer

* Bệnh viện Vạn Hạnh, ** Trung tâm Nghiên cứu Di truyền & Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y – ĐHQG-HCM

Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, việc điều trị vô sinh hiếm muộn, nhất là thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) đã có những bước tiến bộ đáng kể với tỷ lệ thai dao động trung bình khoảng từ 30–40%. Như vậy có đến 60% chu kỳ thất bại trong việc điều trị. Có nhiều nguyên nhân gây ra hiện tượng thất bại nhiều lần như: đáp ứng buồng trứng kém, chất lượng phôi kém, chuyển phôi khó lặp lại nhiều lần^[1-2]. Trong đó, thất bại trong quá trình làm tổ của phôi là một giai đoạn thất bại chính yếu đối với phương pháp điều trị TTTON.

Hiện tượng thất bại làm tổ nhiều lần (Repeated Implantation Failure - RIF) được định nghĩa khi phôi chuyển không có khả năng làm tổ sau một vài chu kỳ điều trị với số phôi tốt được chuyển một cách hợp lý. Tuy nhiên, không có tiêu chí chính thức xác định số lượng chu kỳ thất bại hoặc tổng số phôi chuyển. Theo đó, các trung tâm khác nhau có thể sử dụng các định nghĩa khác nhau cho RIF. Theo một số tác giả, RIF được định nghĩa khi không có thai sau 2–6 chu kỳ IVF, trong đó có hơn 10 phôi tốt được chuyển^[3-4]. Ngày nay, với tỷ lệ thành công của các chu kỳ hiện tại và xu hướng chuyển từ 1-2 phôi, các tác giả đề nghị rằng nên xác định RIF sau khi thất bại 3 chu kỳ liên tiếp, trong đó có từ 1 đến 2 phôi tốt được chuyển trên mỗi chu kỳ^[5]. Hiện nay trên thế giới, nhiều can thiệp về lâm sàng và labo đã

và đang được áp dụng cho các bệnh nhân RIF như liệu pháp miễn dịch, liệu pháp tế bào lympho, soi tử cung, phẫu thuật cắt ống dẫn trứng^[1,6] hay sử dụng Atosiban, một loại thuốc giảm cơn gò tử cung trước khi chuyển phôi^[7]. Về phía labo, chuyển phôi ngày 5, giai đoạn blastocyst có thể là một biện pháp điều trị cho những bệnh nhân RIF.

Trước đây, đa số các trung tâm IVF đều thực hiện chuyển phôi vào giai đoạn phôi ngày 2/ ngày 3 (từ 4-8 tế bào). Hệ thống đánh giá phôi thông thường dựa vào hình thái của phôi bào gồm các chỉ tiêu như số lượng phôi bào, mức độ phân mảnh của phôi, và độ đồng đều của phôi bào. Tuy nhiên, các thông số đánh giá này vẫn chưa cho thấy “khả năng sống” của phôi sau quá trình chuyển phôi. Do đó, nhằm tăng tỷ lệ thai lâm sàng, số lượng phôi chuyển trung bình ở mỗi bệnh nhân dao động từ 3–4 phôi. Với số lượng phôi chuyển càng cao, dẫn đến nguy cơ cao trong quá trình giảm thai. Ngày nay, với kỹ thuật hỗ trợ sinh sản ngày càng phát triển cho phép các trung tâm TTTON kéo dài thời gian nuôi cấy lên giai đoạn phôi ngày 5 (phôi nang – blastocyst). Việc kéo dài thời gian nuôi cấy đến giai đoạn phôi ngày 5 cho phép thu nhận các phôi có sức sống tốt nhất, giảm những phôi có bất thường về di truyền, giảm khả năng đa thai do chỉ chuyển 1-2 phôi.

Chuyển phôi ngày 5 đã được áp dụng từ hơn 10 năm qua, chủ yếu trên nhóm đối

tượng bệnh nhân có tiên lượng tốt^[8]. Bên cạnh đó, chuyển phôi ngày 5 cho nhóm bệnh nhân RIF cũng có thể được áp dụng. Theo một số nghiên cứu ban đầu thực hiện không có nhóm chứng (4 nghiên cứu)^[9-12] và có nhóm chứng (3 nghiên cứu)^[13-15] cho thấy chuyển phôi ở giai đoạn phôi ngày 5 đem lại hiệu quả cao hơn trong nhóm đối tượng thất bại nhiều lần. Đối với nhóm bệnh nhân RIF, Cruz và cộng sự cho rằng tỷ lệ thai và tỷ lệ làm tổ của phôi tăng cao trong nghiên cứu không ngẫu nhiên của tác giả^[13]. Mặt khác, trong một nghiên cứu ngẫu nhiên có nhóm chứng trên bệnh nhân RIF, Levitas và cộng sự cho thấy chuyển phôi ngày 5 chỉ có ích đối với những nhóm bệnh nhân không bị đáp ứng buồng trứng kém. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về tỷ lệ đa thai giữa các nhóm^[16].

Tại IVF Vạn Hạnh, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy phôi ngày 5 từ bệnh nhân có kích thích buồng trứng trong TTON bằng phác đồ kích thích buồng trứng nhẹ (mild stimulation). Từ tháng 8 năm 2011, chúng tôi đã tiến hành triển khai chuyển phôi ngày 5 trên bệnh nhân RIF. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá hiệu quả của chuyển phôi ngày 5 trên các đối tượng này.

Phương pháp nghiên cứu

Đây là nghiên cứu báo cáo loạt ca, được thực hiện trong thời gian từ tháng 8/2011 đến tháng 6/2012 tại IVF Vạn Hạnh. Bệnh nhân được nhận vào nghiên cứu khi thỏa các tiêu chuẩn (1) không có thai sau 3 lần chuyển phôi với ít nhất 8 phôi chất lượng tốt được chuyển, (2) tuổi dưới 40, (3) các xét nghiệm nội tiết trong giới hạn bình thường, (4) kinh nguyệt đều, (5) không có các bất thường về tử cung và buồng trứng và (6) đồng ý tham gia nghiên cứu. Các bệnh nhân có bất thường tử cung, lạc nội mạc tử cung, ứ dịch vòi trứng hay thực hiện TTON bằng kỹ thuật IVM không được nhận vào nghiên cứu này.

Bệnh nhân sau khi kích thích buồng trứng bằng phác đồ GnRH antagonist được tiến hành chọc hút sau 34–36h tiêm hCG dưới sự hướng dẫn của siêu âm đầu dò âm đạo. Noãn sau khi chọc hút được nuôi trong tủ cấy CO₂ trong khoảng 2–3 giờ trước khi được tách bỏ lớp tế bào xung quanh. Noãn của tất cả bệnh nhân trong nghiên cứu được thụ tinh bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI). Noãn sau khi ICSI được chuyển vào môi trường ISM1 (Origio, Đan Mạch) và được nuôi qua đêm trong tủ cấy với CO₂ 6%, 7% O₂. Vào thời điểm kiểm tra thụ tinh, sau 16–18h sau ICSI, noãn được đánh giá sự hiện diện 2PN, phân nhóm 2PN và 1 tế bào. Kiểm tra phôi ngày 2 ở thời điểm 42–44h sau ICSI. Ở giai đoạn phôi ngày 3, vào thời điểm 68h sau ICSI, tiến hành kiểm tra, đánh giá và phân loại chất lượng phôi và chuyển sang môi trường BlastAssist (Origio, Đan Mạch) và tiếp tục nuôi trong tủ cấy 6% CO₂, 7% O₂.

Đánh giá phôi ngày 5 được tiến hành vào sáng ngày 5 (116h) theo tiêu chuẩn đánh giá phôi của đồng thuận Alpha. Phôi trước khi chuyển được cho vào môi trường chuyển phôi có bổ sung hyaluronan (UTM, Orgio, Đan Mạch) trong khoảng thời gian 10 phút. Chuyển phôi được thực hiện với catheter đầu mềm dưới hướng dẫn của siêu âm ngã bụng. Bệnh nhân được hỗ trợ hoàng thể tương tự như các chu kỳ chuyển phôi khác và thử máu (βhCG) sau 11 ngày chuyển phôi. Nếu dương tính, bệnh nhân được siêu âm vào 3 tuần sau đó.

Yếu tố đánh giá kết quả bao gồm: tỷ lệ có phôi ngày 5, tỷ lệ có phôi tốt ngày 5, tỷ lệ thai lâm sàng, tỷ lệ làm tổ của phôi và tỷ lệ đa thai. Số liệu được phân tích bằng phần mềm SPSS 19.1.

Kết quả

Trong thời gian từ tháng 8/2011 đến tháng 6/2012, có 45 bệnh nhân thất bại làm tổ nhiều lần thỏa tiêu chuẩn và được nhận vào nghiên cứu.

Đặc điểm các bệnh nhân RIF ở chu kỳ trước

Bảng 1. Đặc điểm các bệnh nhân RIF ở chu kỳ trước

Tuổi trung bình	31.7±3.3
Số noãn chọc hút trung bình/ca	13.5±5.6
Số noãn ICSI trung bình/ca	10.7 ± 5.2
Tỷ lệ thụ tinh	71.2%
Tỷ lệ phôi tốt ngày 2	58.6%

Tuổi trung bình là 31,7 ± 3,3, tỷ lệ thụ tinh trung bình đạt 71,2%, tỷ lệ phôi tốt ngày 2 là 58,6%. Kết quả này cho thấy không có sự khác biệt so với đặc điểm bệnh nhân ở chu kỳ nghiên cứu (Bảng 2).

Đặc điểm các bệnh nhân RIF tiến hành nuôi phôi ngày 5

Bảng 2. Đặc điểm các bệnh nhân RIF tiến hành nuôi phôi ngày 5

Tuổi trung bình	33,7 ± 4.3
Số chu kỳ điều trị trung bình	3,31 ± 0.9
Số noãn chọc hút trung bình / ca	13,1 ± 6.6
Số noãn ICSI trung bình / ca	11,3 ± 5.8
Tỷ lệ thụ tinh	70,3%
Tỷ lệ phôi tốt ngày 2	59,8%
Tỷ lệ phôi tốt ngày 3	40,3%

Tuổi trung bình là 33,7 ± 4.3, tỷ lệ thụ tinh trung bình đạt 70,3%, tỷ lệ phôi tốt ngày 2 là 59,8%

Kết quả nuôi cấy phôi ngày 5

Bảng 3. Kết quả nuôi cấy phôi ngày 5

Số phôi chuyển ngày 5 trung bình	1,5 ± 0.7
Tỷ lệ số ca có phôi ngày 5	100% (45/45)
Tỷ lệ số ca có phôi tốt ngày 5	35,5% (16/45)
Tỷ lệ β – hCG	53,5% (23/43)
Tỷ lệ thai lâm sàng	41,9% (18/43)
Tỷ lệ làm tổ của phôi	25,3% (21/83)
Tỷ lệ đa thai (2 thai)	16,6% (3/18)

Tất cả 45 trường hợp được chỉ định nuôi phôi ngày 5 đều có phôi chuyển vào ngày chuyển phôi, trong đó có 16 ca (35,5%) có phôi ngày 5 tối ưu và có 2 ca (4,4%) được chỉ định trữ phôi toàn bộ.

Trên 43 ca chuyển phôi, chúng tôi ghi nhận được 18 ca (41,9%) có tim thai. Trong đó, 15 ca có 1 tim thai và 3 ca có 2 tim thai.

Bàn luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của chuyển phôi ngày 5 trên bệnh nhân thất bại làm tổ sau TTON. Kết quả nghiên cứu cho thấy chuyển phôi ngày 5 có thể là một giải pháp hiệu quả cho những đối tượng bệnh nhân này, khi làm tăng tỷ lệ có thai từ 0% ở các chu kỳ điều trị trước lên 41,9% ở chu kỳ điều trị với chuyển phôi ngày 5.

Thất bại làm tổ nhiều lần được xem là một thách thức cho các bác sỹ lâm sàng. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy có sự sụt giảm tỷ lệ thai sau nhiều chu kỳ IVF thất bại liên tiếp^[13]. Nguyên nhân chủ yếu có thể do bất thường trong sự chấp nhận của nội mạc tử cung hoặc do chất lượng phôi chuyển^[17]. Thực tế, khi phôi có chất lượng kém hoặc chất lượng phôi không đồng nhất thì xác suất chuyển phôi có chất lượng không tốt

gia tăng với số lượng phôi chuyển dẫn đến làm giảm tỷ lệ làm tổ của phôi^[17]. Đồng thời phôi chuyển có kích thước không đồng đều có thể làm giảm khả năng làm tổ của phôi^[18].

Thông thường, phôi được chuyển vào giai đoạn 4–8 tế bào (ngày 2 / ngày 3). Chuyển phôi ở giai đoạn phôi nang là một phương pháp gần với sinh lý hơn^[4]. Đồng thời, bộ gen của phôi được hoạt hóa đầy đủ ở giai đoạn 8–10 tế bào. Do đó, nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi nang sẽ có khả năng chọn lựa được phôi có khả năng làm tổ cao, giảm tỷ lệ đa thai.

Đã có một số nghiên cứu cho thấy hiệu quả của chuyển phôi ngày 5 trên đối tượng thất bại nhiều lần. Bốn nghiên cứu đầu tiên đã chứng minh hiệu quả của việc kéo dài thời gian nuôi cấy phôi đến giai đoạn phôi ngày 5 ở nhóm đối tượng này: các cặp vợ chồng có tiền sử ít nhất 3 lần thất bại hoặc ít nhất có 4 lần thất bại^[14–15] hoặc có ít nhất 10 phôi chất lượng tốt để chuyển^[16] trước khi được đề nghị nuôi cấy phôi ngày 5. Kết quả thai lâm sàng được ghi nhận ở 4 nghiên cứu tương ứng 30%, 44%, 21% và 29%. Tuy nhiên những kết quả này cần phải tiếp tục nghiên cứu bởi vì thực hiện không có nhóm chứng và thực hiện không có tính đồng nhất của quần thể nghiên cứu.

Hai thử nghiệm có nhóm chứng ngẫu nhiên đã chỉ ra rằng chuyển phôi nang sau khi thất bại làm tổ với chuyển phôi ngày 2–3 có thể mang lại kết quả cao hơn đáng kể về tỷ lệ thai và tỷ lệ sinh sống^[4,8]. Cải tiến trong lựa chọn phôi chuyển và khả năng tiếp nhận của tử cung có thể giải thích cho lợi ích của việc chuyển phôi ở giai đoạn phôi nang cho các cặp vợ chồng với RIF.

Đối tượng bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi có ít nhất 3 lần thất bại liên tiếp. Mặc dù đây chỉ là nghiên cứu loạt ca, nhưng các thông số điều trị trong các chu kỳ trước có thể được sử dụng như nhóm chứng. Dữ liệu cho thấy những đặc điểm bệnh nhân điều trị trong đợt nghiên cứu

không có sự khác biệt so với đặc điểm bệnh nhân của các chu kỳ điều trị trước. Kết quả ban đầu chúng tôi đạt được 100% chu kỳ có phôi ngày 5 để chuyển. Kết quả này cao hơn so với kết quả của Levitas và cộng sự^[16] (74% chu kỳ có phôi ngày 5 để chuyển) và Guerif và cộng sự^[17] (90% chu kỳ có phôi ngày 5 để chuyển). Mặc dù số lượng bệnh nhân RIF trong nghiên cứu của chúng tôi (n=45) không nhiều so với hai tác giả Levitas và cộng sự (n=54) và Guerif và cộng sự (n=129), song kết quả thu được bước đầu này cho thấy sự ổn định và hiệu quả trong việc nuôi cấy phôi ngày 5 và có thể có liên quan đến tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ đạt được lần lượt là 41,9% và 25,3%; tương tự với tác giả Guerif (34,1%; 25,4%) và Levitas (29,4%; 21,2%)^[16–17]. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu còn cho thấy tỷ lệ có thai và tỷ lệ làm tổ có thể phụ thuộc và số phôi chuyển có chất lượng tốt vào ngày 5. Trong đó, nếu chuyển 1 phôi ngày 5 có chất lượng tốt, tỷ lệ thai lâm sàng đạt được 37,5% với tỷ lệ làm tổ là 28,6%; nếu chuyển 2 phôi ngày 5 có chất lượng tốt, tỷ lệ thai lâm sàng tăng lên 50% với tỷ lệ phôi làm tổ là 33,3%. Do số lượng cỡ mẫu còn ít và chưa có sự khác biệt thống kê, với kết quả ban đầu, chúng tôi ghi nhận rằng có thể chất lượng phôi có ảnh hưởng đến kết quả thai lâm sàng khi chuyển từ 1–2 phôi nang có chất lượng tốt.

Điểm đặc biệt là kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ có thai tăng từ 0% ở các chu kỳ điều trị trước so với 41,9% ở chu kỳ điều trị, trong khi các đặc điểm chính của các chu kỳ điều trị trước và hiện tại là không thay đổi. Khác biệt duy nhất là các chu kỳ điều trị trước, bệnh nhân được chuyển phôi giai đoạn phân chia (ngày 2) và ở chu kỳ điều trị này, toàn bộ bệnh nhân được chuyển phôi ngày 5. Số lượng phôi chuyển cũng khác biệt. Ở các chu kỳ trước, có ít nhất 3–4 phôi tốt được sử

dụng trong mỗi lần chuyển phôi, trong khi số phôi chuyển trung bình trong chu kỳ nghiên cứu ít hơn rất nhiều (trung bình là 1,5 phôi). Điều này có thể cho thấy trên những bệnh nhân RIF, thất bại làm tổ có thể có liên quan đến quá trình chọn lựa phôi để chuyển. Ở giai đoạn ngày 2, việc lựa chọn phôi chuyển dựa vào tiêu chuẩn hình thái có vẻ chưa có hiệu quả trong việc lựa chọn được những phôi “tối ưu”, có khả năng phát triển và làm tổ cao nhất. Trong khi đó, việc kéo dài thời gian nuôi cấy in vitro đến giai đoạn phôi nang có thể giúp loại bỏ những phôi có sức sống kém. Tuy nhiên, việc triển khai nuôi cấy phôi ngày 5 có những nguy cơ nhất định, trong đó, việc không có phôi để chuyển

cần được quan tâm và tư vấn kỹ với bệnh nhân trước khi điều trị. Tình trạng này có thể được hạn chế nếu các quy trình hoạt động trong labo TTTON được kiểm soát chặt và hoạt động có hiệu quả.

Kết luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên về chuyển phôi ngày 5 trên đối tượng thất bại làm tổ nhiều lần tại Việt Nam. Kết quả bước đầu đạt được tại trung tâm chúng tôi cho thấy quy trình nuôi cấy phôi ngày 5 khá ổn định và đem lại những hiệu quả thể hiện trên tỷ lệ thai lâm sàng và tỷ lệ làm tổ. Việc chuyển phôi ngày 5 có thể là một trong những phương pháp hiệu quả nhằm cải thiện tỷ lệ thành công của một chu kỳ điều trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kim DL, Aziz N, Agarwal JSA. Evidence - based management of infertile couples with repeated implantation failure following IVF. *Curr Women's Health Reviews* 2010; 6: 200 – 218.
2. Laufer N and Simon A. Recurrent implantation failure: current update and clinical approach to an ongoing challenge. *Fertil Steril* 2012; 97:1019-20.
3. Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T. Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 2006;21:3036-43.
4. Tan BK, Vandekerckhove P, Kennedy R, Keay SD. Investigation and current management of recurrent IVF treatment failure in the UK. *BJOG* 2005;112:773–80.
5. Das M and Holzer H. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. *Fertil Steril* 2012; 97:1021-7
6. Simon A and Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil Steril* 2012; 97:1039-43.
7. Vuong Thi Ngoc Lan, Vu Nhat Khang, Giang Huynh Nhu and Ho Manh Tuong. Atosiban improves implantation and pregnancy rates in patients with repeated implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:254-60.
8. Blake D, Farquhar C, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 4.
9. Menezo Y, Hazout A, Dumont M et al. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 1992; 7 (suppl. 1):101–106.
10. Jayot S, Parneix I, Verdaguer S et al. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995; 63:109–114.
11. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1994; 9:2367–2373.
12. Guerin JF, Nicolle B Interest of co-

- cultures for embryos obtained by in-vitro fertilization: a French collaborative study. *Hum Reprod* 1997; 12:1043–1046.
13. Cruz JR, Dubey AK, Patel J, Hartog B, Gindoff PR. Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple in vitro fertilization failures? *Fertil Steril*. 1999; 72: 218 – 220.
 14. Levran D, Farhi J, Nahum H, Royburt M, Glezerman M, Weissman A. Prospective evaluation of blastocyst stage transfer vs. zygote intrafallopian tube transfer in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2002; 77: 971 – 977.
 15. Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J et al. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84:2638–2646.
 16. Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, Albotiano S, Sonin Y, Hackmon-Ram R, Potashnik G. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2 – 3 embryo transfer cycles: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2004; 81: 567 – 571.
 17. Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, Royere D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod BioMed Online* 2004; 9:630-636.
 18. Kolibianakis E Blastocyst culture: facts and fiction. *Reprod BioMed Online* 2002; 5: 285–293.